บทที่ 2

การทดลอง สารเคมีและอุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นลิงหางยาวเพศเมีย ในตระกูล Macaca fascicularis จำนวน 3 ตัว จากโคโลนี ของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเลี้ยงลิงไว้ทั้ง 2 เพศ และมีวัยต่างๆ กันรวมทั้งสิ้น 120 ตัว ลิงแต่ละตัวเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยว ทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิม ขนาดของกรงกว้าง 24 นิ้ว สูง 34นิ้ว และลึก 28 นิ้ว เรือนเลี้ยงลิงกรุด้วยลวดตาข่าย และมุ้งลวดมีพัดลมดูดอากาศทำให้อากาศถ่ายเทได้สะดวกเหมือนสภาพธรรมชาติ อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสัตว์สำเร็จรูป (บริษัทเจริญโภคภัณฑ์) และเสริมด้วยอาหารจำพวก กล้วย มันเทศ แตงกวาและสับปะรด ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00-9.00 น. และ 15.00-16.00 น. นอกจากนี้ยังให้ไข่ต้มสัปดาห์ละ 2 ฟองต่อตัว และวิตามิน neutroplex ครั้งละ 5 ซีซี ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลอง

ลิงที่ใช้ในการทดลองมีอายุตั้งแต่15-20ปี มีสุขภาพสมบูรณ์ ไม่ผ่านการทดลองหรือให้ยาใดๆ มามากกว่า 2 ปี และสังเกตพบว่ามีประจำเดือน ก่อนหน้าที่จะนำมาทำการทดลอง 2 ครั้ง และไม่เคยมีประวัติการตั้งครรภ์

ประวัติลิงทดลอง

ลิงหมายเลข 5 นำมาจาก อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จากการดู Third molar และประวัติของลิงประกอบกันพบว่ามีอายุประมาณ 15 ปี น้ำหนัก 3.9 กิโลกรัม ช่องคลอดมีขนาดเล็กพบ sexual skin มีสีแดงจาง ประจำเดือนแต่ละครั้งประมาณ 2-3 วัน และมีระยะห่างไม่สม่ำเสมอ เคยนำไปผสมพันธุ์ แต่ไม่พบการตั้งครรภ์

ลิงหมายเลข6 นำมาจากจังหวัดทางภาคใต้จากการดู third molar และประวัติของลิงประกอบกันพบว่ามีอายุประมาณ 6 ปี น้ำหนัก 5 กิโลกรัม มีพฤติกรรมค่อนข้างจะขี้กลัวและตกใจง่าย พบว่า sexual skin มีสีแดงค่อนข้างจาง ระยะห่างของการเกิดประจำเดือนแต่ละครั้ง ประมาณ 2-3 วัน และมีระยะห่างไม่สม่ำเสมอเคยนำไปผสมพันธุ์แต่ไม่พบการตั้งครรภ์

ลิงทดลองหมายเลข 28 นำมาจากจังหวัดทางภาคใต้จากการดู third molar และประวัติของลิงประกอบกัน พบว่ามีอายุประมาณ 18-20 ปี น้ำหนัก 7.5 กิโลกรัม แขนข้างซ้ายด้วน มีแผลผ่าตัดที่บริเวณหน้าท้องเนื่องจากเคยมีผู้จะนำไปทำการทดลองโดยนำไปผ่าตัดแต่เนื่องจากรอบประจำเดือนไม่สม่ำเสมอจึงไม่ได้นำมาใช้ในการทดลอง ลิงตัวนี้มีพฤติกรรมดุ และก้าวร้าวมาก sexual skin มีสีแดงจาง ระยะห่างของการเกิดประจำเดือนแต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ เคยนำไปผสมพันธุ์ แต่ไม่พบว่ามีการตั้งครรภ์เกิดขึ้น

<u>วิธีการทดลอง</u>

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ระยะ

ระยะที่ 1 เก็บซีรัมในระยะก่อนตัดรังไข่

ระยะที่ 2 ตัดรังไข่และนำไปศึกษาทาง Histology

ระยะที่ 3 เก็บซีรัมในระยะหลังตัดรังไข่

เก็บซีรัมโดยการเจาะเลือด ก่อนเจาะเลือดทุกครั้ง ฉีดยา ketamine hydrochlorideเพื่อลดความเครียดขณะเจาะเลือด โดยฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อในปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมลิงแต่ละตัวจะได้รับการเจาะเลือดบริเวณ femoral vein ครั้งละ 4-5 ซีซี. ในช่วงเวลา 8.00-9.00 น. เจาะเลือดห่างกัน 2 วัน/ครั้ง ในระยะก่อนตัดรังไข่เจาะเลือดนาน 2 รอบประจำเดือน และในระยะหลังตัดรังไข่เจาะเลือดต่ออีกเป็นเวลา6 เดือนเลือดที่เจาะแต่ละครั้งเก็บไว้ในหลอดทดลองที่ปิดด้วยแผ่นพาราฟิลม์ ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที ใช้พลาสเตอร์ปิเปตแยกซีรัมที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนที่ต้องการด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การตัดรังไข่

เมื่อเจาะเลือดครบกำหนด 2 รอบประจำเดือน ได้ทำการตัดรังไข่โดยใช้หลัก Aseptic Technique ทำการผ่าตัดในห้องผ่าตัด โดยให้สัตว์ทดลองงดอาหารและน้ำ 12 ชั่วโมงก่อนที่จะทำการผ่าตัด สัตว์ทดลองถูกทำให้สลบโดยใช้ ketamine hydrochloride ปริมาณ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อและ atropine sulfate 0.5 มิลลิลิตร ในสัตว์ทดลองแต่ละตัว Atropine sulfate ฉีดเพื่อยับยั้งการหลั่งของต่อมน้ำลาย เมื่อสัตว์ทดลองสลบได้โกนขนบริเวณหน้าท้องและทำความสะอาดด้วย pevidine solution จากนั้นก็เปิดหน้าท้องตัดรังไข่และปีกมดลูกทั้ง 2 ข้าง ออกแช่ในน้ำยาเพื่อที่จะนำส่วนต่าง ๆ ไปศึกษาทาง Histology ให้แน่ใจว่าส่วนที่ตัดออกมาเป็นรังไข่แน่นอน จากนั้นปิดหน้าท้อง ฉีดยาแก้อักเสบ penicillin-streptomycin เข้ากล้ามเนื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อรักษาการอักเสบของแผลผ่าตัดพร้อมทั้งสังเกตอาการจนกว่าแผลจะหายดี

การเตรียมรังไข่เพื่อศึกษาทาง Histology

วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อของรังไข่เพื่อศึกษาทาง Histology ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้ นำรังไข่ที่แช่ในน้ำยา Bouin นาน 18-24 ชม. ไปล้างด้วย 70 % เอทธิลแอลกอฮอล์ นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาดูดน้ำออก (dehydration) ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 90% 95% 100% จนถึง xylene ผ่าน paraplast แล้วนำไปฝังใน paraplast ทิ้งไว้ให้เย็น ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมครอน ด้วยไมโครโตม ย้อมสี Hematoxylene และ Eosin ดูลักษณะของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (radioimmunoassay : RIA) ได้แก่

1. ฮอร์โมน

Testosterone standard

Batch NO. 83/N., WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

Progesterone standard

Batch NO. 81/J., WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

Estradiol Standard

Batch NO. 81/J., WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

Cortisol Standard

Batch NO. K 079510., WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

Human LH Standard

Lot GLSA contain purified Human LH in Equine Serum with 0.1 %

Sodium azide exp 7/87

FSH Standard

WHO MRP 1986 CH-5303 Isotope production Wurenlinger

2. แอนติซีรัม

Antiserum to Testosterone : Batch NO. K 888510

WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

Antiserum to Progesterone : Batch NO. K 078910

WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

Antiserum to Oestradiol : Batch NO. K 158310

WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

Antiserum to Cortisol : Batch NO. K 907010

WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

Antiserum to FSH : WHO,MRP H 31 rhesus FSH,1986

Anti-rabbit IgG (whole molecule) : Lot 54F-8835,

Sigma chemical Company, U.S.A.

Antiserum to Human LH : Lot L21187

3. สารติดสลากรังสี

^{3}H-Testosterone Testosterone : Batch NO. B 54, Amersham

International, Plc, England

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{3}H-Progesterone Progesterone : Amersham International Plc, England

^{3}H-Oestradiol Oestrogen : Amersham International, Plc, England

^{3}H-Cortisol Cortisol : Amersham International Plc, England

Tracer ^{125}I-H FSH Batch No : W-8602 exp 30. 3.86
: W-8606 exp 3. 8.86
: W-8611 exp 28.12.87

Tracer ^{125}I-H LH Lot.(21187) exp 4.11.87

4. สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ สเตียรอยด์ ฮอร์โมน โดยวิธี RIA

- Charcoal reagent : Batch No. 82/83/R, WHO RIA Reagent Programme Switzerland
- Dextran reagent : Batch No. 82/83/8, WHO RIA Reagent Programme Switzerland
- Dietyl ether : E Merck, Darmstadt, Germany.
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) M.W. 120 : No. 01169297 AR Grade BHD chemical Ltd. England.
- Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) M.W. 142 : NO. 011986 AR Grade BHD chemical Ltd. England
- Sodium chloride(NaCl) M.W. 58.44 : NO. 2427997, May & Baker Ltd. England.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Thiomersal (merthiolate) : NO. T-5152, Sigma chemical company U.S.A.
- Gelatin : Difco laboratory, U.S.A.
- Liquifluor : NO. NEF-903, New England Nuclear, Boston, U.S.A.
- Toluene : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Dioxane : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Ketamine hydrochloride : Parke Davis, PTU Ltd., Australia
- EDTA (M.W. 372.2) : NO. 1-8993, J.T. Baker chemical Company, U.S.A.

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weight, W.M. Ainsworth and Sons Inc., U.S.A.
2. เครื่องชั่งหยาบ : Mettler E 200, Mettler Instrument, Switzerland.
3. Magnetic Stirrer : S-18520, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
4. Mixer : M-16715, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
5. pH meter : 5989, Cole Parmer Instrument Company, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. Refrigerated Centrifuge : Model PR-J, International Equipment Company, U.S.A.

7. Dynac Centrifuge : Clay adams,Becton Dickinson and Company Parsippany U.S.A.

8. Dri-Block Heater : Model DB-3, Tecam Laboratory and Industrial Equipment U.S.A.

9. Gamma Counter : LKB Multigamma Counter Model 1260 Multi gamma II,LKB Wallac, Finnland.

10. Beta-liquid Scintillation Counter : Model BPL, Packard Instrument, Co., U.S.A.

11. Micropipette : Pipetteman M 81 Gilson France, Eppendorff 3130 Germany ; Pipette Gun Clay Adams, U.S.A.

12. Dunoff Incubator Shaker : Model 3575-1, Lab-line Instrument Inc., U.S.A.

13. Phase Contrast Microscope : AO Series 10,American Optical Co., U.S.A.

14. Light Microscope : Model CKP, Olympus Inverted Microscope, Tokyo, Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

การเตรียม สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ ฮอร์โมน โดยวิธี RIA

ก. Assay buffer เตรียมโดยใช้สารต่อไปนี้

ละลาย Gelatin 1.00 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร อุ่นให้ Gelatin ละลายจนหมดทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงละลาย

Sodium dihydrogen phosphate anhydrous 2.35 กรัม

Disodium hydrogen phosphate anhydrous	11.60 กรัม
Sodium chloride	8.80 กรัม
Thiomersal	0.10 กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

ข. Charcoal Suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มิลลิลิตร เติม charcoal 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน เมื่อจะใช้นำไปกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ใช้

ค. Counting Solution

ได้จาก Toluene	3000	มิลลิลิตร
Liquiflour	128	มิลลิลิตร
Dioxane	600	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

1. การเตรียมฮอร์โมนมาตรฐาน อิสตราไดออล โปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน และ คอร์ติซอล

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานอิสตราไดออล

เตรียมโดยใช้สารละลายมาตรฐาน อิสตราไดออล WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 16 นาโนโมล/ลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย อิสตราไลออล มาตรฐานซึ่งมีความเข้มข้น 1600 เฟมโตโมล /มิลลิลิตร จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1600 เฟมโตโมล /มิลลิลิตรถึง 48 เฟมโตโมล/มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันทีดังตาราง 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน อีสตราไดออล จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่ความเข้มข้น เฟมโตโมล/ลิตร

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายมาตรฐานอิสตราไดออล ปริมาณ (มิลลิลิตร)	บัฟเฟอร์ที่ใช้ผสม (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นเฟมโตโมล /มิลลิลิตร
หลอดที่ 1	0.5	4.5	1600
2	2.0	2	800
3	2.0	2	400
4	2.0	2	200
5	2.0	2	100
6	2.0	2	48

1.2 การเตรียมฮอร์โมนมาตราฐานโปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน เตรียมในลักษณะเดียวกันกับอีสตราไดออล โดยเตรียมจาก stock solution ที่ความเข้มข้นดังนี้ โปรเจสเตอโรน จาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 250 พิโครโมล/มิลลิลิตร จากนั้นทำ serial dilution ของฮอร์โมนมาตราฐาน โปรเจสเตอโรน ให้มีความเข้มข้น 2500, 1250, 625, 312, 156, และ 78 เฟมโตโมล/มิลลิลิตร เทสโทสเตอโรน จาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 220 พิโครโมล/มิลลิลิตร จากนั้นทำ serial dilution ของฮอร์โมนมาตราฐานเทสโทสเตอโรน ให้มีความเข้มข้น 2,220, 1,110, 555, 277,138, และ 69 เฟมโตโมล/มิลลิลิตร

1.3 สำหรับฮอร์โมนมาตราฐานของ คอร์ติซอลเตรียมได้ดังนี้คือ :-

สารละลายมาตราฐาน คอร์ติซอล เตรียมอยู่ใน ethanolic solution ที่ความเข้มข้น 6.0 ไมโครโมล/ลิตร ทำให้ปิเปต และ ampule เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำมาใช้แบ่งสารละลาย คอร์ติซอล มาตราฐาน เป็น 3 ขวด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็น stock standard แล้วนำมาใช้ที่ละขวด โดยนำ stock

016602

standard มาเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันได้ดี นำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยแช่ใน dunoff shaker ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เขย่าให้เข้ากันและนำไปไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำมาใช้สารละลายนี้จะมีความเข้มข้น 60 นาโนโมล/ลิตร หรือ 6,000เฟมโตโมล/มิลลิลิตรเป็น solutionB และเมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจะอยู่ได้นาน 2-3 สัปดาห์ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการเตรียมสารละลาย คอร์ติซอล มาตรฐานจากสารละลายตั้งต้นที่ความเข้มข้น เฟมโตโมล/มิลลิลิตร

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายมาตรฐาน คอร์ติซอล (6000) เฟมโตโมล/มิลลิลิตร	Buffer ที่ใช้ผสม มิลลิลิตร	ความเข้มข้น
solution B (1)	100 มิลลิลิตร	10	6,000 เฟมโตโมล/ลิต
2	1 มิลลิลิตร	1	3,000 เฟมโตโมล/ลิต
3	1 มิลลิลิตร	1	1,500 เฟมโตโมล/ลิต
4	1 มิลลิลิตร	1	750 เฟมโตโมล/ลิตร
5	1 มิลลิลิตร	1	375 เฟมโตโมล/ลิตร
6	1 มิลลิลิตร	1	187 เฟมโตโมล/ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมออร์โมนติดสลากรังสี

2.1 การเตรียมออร์โมนติดสลากรังสีของ อีสตราไดออล

เตรียมโดยใช้ stock tracer ซึ่งมีความแรง (specific activity) 10ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตรปิเปตมา 100 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรี/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมออร์โมนติดสลากรังสีของโปรเจสเตอโรนเหมือนกับ อีสตราไดออล

2.3 การเตรียมออร์โมนติดสลากรังสีของ เทสโทสเตอโรน

เตรียมโดยใช้ stock testosterone tracer ที่มีความแรง 5 ไมโครคูรี/มิลลิลิตร จำนวน1 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรี/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเตรียมออร์โมนติดสลากรังสีของ คอร์ติซอล

เตรียมโดยใช้ stock cortisol tracer ที่มีความแรง10ไมโครคูรี /มิลลิลิตร จำนวน 150 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรี/มิลลิลิตร

3. การเตรียม แอนติซีรัม

3.1 การเตรียม แอนติซีรัมของอีสตราไดออล

เตรียมโดยใช้ แอนติซีรัม ซึ่งอยู่ในสภาพที่ระเหยแห้งจาก WHO นำมาเติม 10 มิลลิลิตร assay buffer เขย่าให้ละลายเตรียมแล้วใช้ได้ทันที

3.2 การเตรียม แอนติซีรัม ของ โปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน และ คอร์ติซอล เช่นเดียวกับ อีสตราไดออล

4. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ โปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน และ อีสตราไดออล โดยวิธี RIA (radioimmunoassy)

ตามวิธีการของ องค์การอนามัยโลก (Sufi et al.,1986) ดังนี้

การสกัดซีรัมเพื่อหาฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน และ อิสตราไดออล ด้วยสารละลาย อีเทอร์

ปิเปตซีรัม ลงไปในหลอดทดลองที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างละ 2 หลอด แล้วเติมอีเทอร์ 5 ซีซี เขย่าให้เข้ากันด้วย Mixer นาน 1 นาที ปล่อยให้แยกชั้นแล้วนำไปแช่แข็งใน ethanol กับ dry ice โดยแช่เฉพาะชั้นล่าง ชั้นล่างซึ่งเป็นน้ำก็จะแข็งตัว รินส่วนของอีเทอร์ลงในหลอดทดลองเปล่าอีกชุดหนึ่งแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยการตั้งทิ้งไว้ใน dri-block heater ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส นำหลอดทดลองที่ทำให้อีเทอร์แห้งดีมาทำ RIA ต่อไป โดยเติมสาร ดังตารางที่ 3 เติม assay buffer 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันอีก 1 นาที ให้ฮอร์โมนลงไปอยู่ใน buffer ตั้งทิ้งไว้สักครู่ ปิเปต tracer 100 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม แอนติบอดี ลงไปอีก หลอดละ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางในถาดที่มีน้ำแข็งแล้วจึงเติม charcoal suspension 200 ไมโครลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกเอาส่วน free form ที่จับอยู่กับ charcoal ออกที่ความเร็ว (2,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที เทส่วนที่เป็น bound form ใส่ใน counting vial เติม scintillation fluid 4.5 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง γ-counter นาน 5 นาที ต่อ vial

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการทำ RIA ของ ฮอร์โมน สเตียรอยด์

หลอดทดลอง	assay buffer	tracer	antibody		charcoal
Tc	600 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร		ทิ้งไว้	-
NSB	600 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร		ที่ 4	200 ไมโครลิต
TBo	500 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	องศา	200 ไมโครลิต
standard	500 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	เซล	200 ไมโครลิต
or sample				เซียส	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของการสกัดหาโดย การทำ REC (recovery of extraction) และ TCR (total count recovery)

RCE (recovery of extraction) เตรียมโดย

ใช้ working tracer ที่เจือจาง 10 เท่าจำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับซีรัมของลิงหางยาวเพศเมีย 50ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปสกัดด้วย ไดเอธิลอีเทอร์นาน 1 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำและซีรัมออกไประเหยไดเอธิลอีเทอร์ออกไป จนหมด เติม assay buffer 700 ไมโครลิตร เขย่าแล้วเทใส่ใน counting vial

การสกัดซีรัมเพื่อหาออร์โมน คอร์ติซอล

ปิเปตซีรัมที่ต้องการสกัดใส่หลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด ใส่น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใน water bath (เพื่อ denature cortisol binding globulin) เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำมา เขย่าให้เข้ากัน แล้วปิเปตมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด แล้วเติมสารดังตารางที่ 4

เติม tracer 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

เติม antiserum 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

เติม assay buffer 400 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

นำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

นำมาเติม charcoal 200 ไมโครลิตร ทำให้ทั้งระบบอยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่านานหลอดละ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

เทใส่ vial อย่างเร็วเติม scintillation fluid 4.5 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปวัดรังสีด้วยเครื่อง β- counter นาน 5 นาทีต่อ vial

ตาราง 4 แสดงขั้นตอนการเติมสารละลายสำหรับการหาฮอร์โมน คอร์ติซอล

หลอดทดลอง	Buffer	Tracer working	Antibody		Charcoal
Tc	500 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร		ทิ้งค้าง	-
NSB	500 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร		คืนไว้	200 ไมโครลิตร
TBo	400 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	ที่ 4 องศา	200 ไมโครลิตร
standard	400 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร	เซลเซียส	200 ไมโครลิตร
or sample					

การเตรียมสารละลายตั้งต้นสำหรับ FSH RIA

Stock Solution (a) = $NaH_2PO_4H_2O$ 0.2 M (M.W. 137.99) 27.89 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Stock Solution (b) = $Na_2HPO_4.2H_2O$ (M.W. 177.99) 35.69 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม Buffers

1. Phosphate buffer 0.1 M pH 7.2

Stock solution (a)	280	มิลลิลิตร
Stock solution (b)	720	มิลลิลิตร
Sodium azide	2.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	2000	มิลลิลิตร

2. 1% BSA Phosphate buffer pH 7.2 (tracer buffer dilution)

   Phosphate buffer 1000 มิลลิลิตร pH 7.2

   BSA 10 กรัม

3. Sample buffer (samples and standards buffer dilution)

   1% BSA-buffer 100 มิลลิลิตร

   NaCl 7.2 กรัม

   Sodium azide 1 กรัม

4. Phosphate-EDTA buffer (second antibody buffer dilution)

   EDTA 18.6 กรัม (M.W. 372.24)

   0.1 M Phosphate buffer 800 มิลลิลิตร

   Adjust pH ของ NaOH 7.2

   เติม Phosphate buffer ให้ได้ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร

5. Antibody buffer (first antibody buffer dilution)

   1% BSA-Phosphate buffer 100 มิลลิลิตร

   Normal rabbit serum 50 ไมโครลิตร

วิธีเตรียม Standard และ Sample

Standard

Cynomolgus FSH standard WHO MRP 1986 WDP CH-5303 Wurenlinger concentration 500 mIU/vial ละลายใน sample buffer 2.5 มิลลิลิตร

standard curve dilution A = 40 mIU/ml

ทำ serial dilution

1.0 มิลลิลิตร dil. A + 1.0 มิลลิลิตร sample buffer (20 mIU/ml)

1.0 มิลลิลิตร dil. 1 + 1.0 มิลลิลิตร sample buffer (10 mIU/ml)

1.0 มิลลิลิตร dil. 2 + 1.0 มิลลิลิตร sample buffer (5 mIU/ml)

1.0 มิลลิลิตร dil. 3 + 1.0 มิลลิลิตร sample buffer (2.5 mIU/ml)

1.0 มิลลิลิตร dil. 4 + 1.0 มิลลิลิตร sample buffer (1.25 mIU/ml)

1.0 มิลลิลิตร dil. 5 + 1.0 มิลลิลิตร sample buffer (0.62 mIU/ml)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tracer I^{125} h FSH

ละลาย Iodinated human FSH ด้วย 1% BSA-phosphate buffer

แอนติซีรัม (Antiserum)

ละลาย anti-ovine FSH serum 1 vial ด้วย antibody buffer 10 มิลลิลิตร (Final dilution = 1:40,000)

Second antibody

Antirabbit gammaglobulin serum 1 มิลลิลิตร เติม second antibody buffer = 19 มิลลิลิตร final dilution = 1:20

Low gonadotropin serum (LGP)

เตรียมโดย - นำ pool serum ใส่ แอนติซีรัม โดยใช้ 1 ขวด : buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

- เติม antirabbit gammaglobulin ที่มี dilution 1: 200 (IgG antirabbit 1 มิลลิลิตร :serum 200 มิลลิลิตร)
- นำมาปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 45 นาที เทส่วนที่ใสเก็บไว้ใช้

ค่าความแม่นยำของ assay หาได้โดยการทำ Quality control 3 dilution

- ใช้ ovariectomized monkey ค่าสูง กลาง ต่ำ เป็นความแม่นยำของ intra assay variation
- ใช้ pool male monkey serum เป็นความแม่นยำของ inter assay variation

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ FSH จากตัวอย่าง (ตารางที่ 5)

ปิเปตตัวอย่างซีรัมใส่ในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด ทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสถ้าสารตัวอย่างไม่ถึง200ไมโครลิตรให้ปรับปริมาตรด้วย standard buffer ให้ครบ 200 ไมโครลิตร

เติม tracer 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เติม แอนติซีรัม 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลอดที่เป็น NSB ไม่ต้องใส่แอนติซีรัม ทุกหลอดเติม buffer 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

เติม IgG antirabbit 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เติม LGP อีก 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ทุกหลอดทดลอง (ยกเว้น Tc) แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 4,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที เทส่วนใสทิ้งไปเช็ดรอบหลอดทดลองให้แห้งนำตะกอนไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Gamma counter (LKB Mutigamma counter model 1260 Multigamma II) ซึ่งเครื่องตรวจวัดปริมาณรังสีนี้จะสร้างกราฟมาตรฐาน และอ่านค่าปริมาณฮอร์โมนในซีรัมตามแต่โปรแกรมที่ป้อนเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้โปรแกรม logit transformation

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการทำ RIA ของ r FSH

	Day I				Day 2,3	Day 4				Day 5
	Sample std.	sample buffer	Tracer	Antibody		2 Antibody	LGS	Tracer buffer		เติมน้ำกลั่น
	µl	µl	µl			µl	µl	µl		3 มิลลิ ปั่นที่4,500 รอบ นาน 45 นาที เทส่วนใสทิ้ง เช็คหลอดทดลอง ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจวัด ปริมาณสาร
Tc	-	-	100	100	incubate	-	-	-	incubate	
NSB	-	200	100	100 *	ที่ 4°C	100	200	-	ที่ 4 C	
Bo	-	200	100	100	48hrs.	100	200	-	24 hrs	
Std	200	-	100	100		100	200	-		
Sample	100	100	100	100		100	100	100		

* เติม Antibody buffer แทน Antibody

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาปริมาณ LH โดยวิธี RIA ใช้ kit จากบริษัท American Bioclinical (4432 SE 16th Avenue Portland, 097202)

Reagents

1. luteinizing hormone standards catalog No.40047 แต่ละ Set ของ standards ประกอบด้วย standard A (Zero concentration) 4 มิลลิลิตร และ แต่ละความเข้มข้นอีก 6 ระดับๆ ละ 2 มิลลิลิตร เป็น standard B ถึงG แต่ละ standard เตรียมจาก purified human LH ใน equine serum และนำไป calibrated กับ LER 907 เป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่จะเปลี่ยนเป็น mIU/ml based on second IRP HMG

2. Rabbit antiserum to luteinizing hormone catalog No. 30072 rabbit antiserum ต่อ LH phosphate buffer และ sodium azide

3. LH I-125 NO. 20070

แต่ละ vial ประกอบด้วย LH^{125}I 10 ไมโครคูรี ใน phosphate /EDTA buffer ที่มี (BSA) bovine serum albumin อยู่ปริมาณ 15 มิลลิลิตร rabbit gamma gloubulin และ sodium azide

4. precipitating reagent No. 50095

แต่ละ vial ประกอบด้วย phosphate buffer, antirabbit gammaglobuin, polyethyleneglycol และ sodium azide เป็น preservative

วิธีการ assay

- reagent และ specimen ทำที่อุณหภูมิห้อง
- standard และ unknown serum ทำ duplicate
- label tube ดังต่อไปนี้ Tc, NSB, standard A-G, unknown serum
- ปิเปต standard A 200 ไมโครลิตร ใน NSB tube และ standard tube A
- ปิเปต 200 ไมโครลิตร standard B ใส่ tube B และ standard C,D,E,F,G ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ปิเปต antiserum 100 ไมโครลิตร ใส่ทุก tube ยกเว้น Tc และ NSB เขย่าให้เข้ากันนาน 3 วินาที
- Incubate 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- ปิเปต $LH^{125}I$ 100 ไมโครลิตร ใสทุก tube เขย่าให้เข้ากันนาน 3 วินาที
- Incubate อีก 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- เติม precipitating reagant 1 มิลลิลิตร ทุก tube ยกเว้น Tc เขย่าให้เข้ากันนาน 3 วินาที
- นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 xg นาน 15 นาที ทุก tube ยกเว้น Tc
- เทส่วนที่ใสออกทุก tube ยกเว้น Tc
- นำไป count โดยใช้ gamma counter นานหลอดละ 30-60 วินาที
- ก่อนทำเราใช้ QC ของห้อง lab เป็น human serum เพื่อเปรียบเทียบค่า Intra assay นำมาทำพร้อมกันกับ sample

การวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$) เปรียบเทียบค่าของความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ student's unpaired t-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ two way analysis of variance พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือที่ $P < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย